

ÉTUDE ULTRASTRUCTURALE  
DE *MARTEILIOIDES CHUNGMUENSIS* N.G., N.SP.  
PARASITE DES OVOCYTES  
DE L'HUITRE *CRASSOSTREA GIGAS* TH.

Michel COMPS

IFREMER, 1, rue Jean Vilar, 34200 Sète

M.S. PARK

Fisheries Research and Development Agency, Busan, Corée

Isabelle DESPORTES

Cytophysiologie des Protozoaires, 105, boulevard Raspail, 75006 Paris  
& UA 138, CNRS, 63170 Aubière

RÉSUMÉ

Etude ultrastructurale du parasite d'abord signalé en 1978 en Corée, dans les ovocytes de l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* puis retrouvé en 1984 dans des huîtres de la baie de Chungmu. Les stades observés sont typiques de ceux des représentants de la classe des Paramyxea LEVINE 1980. Le développement consiste en la production dans une cellule souche dite primaire de cellules secondaires qui elles-mêmes donnent naissance à une cellule tertiaire. L'évolution particulière de la sporogénèse aboutissant à la formation d'une seule spore tricellulaire par sporonte distingue ce parasite des autres Paramyxea.

**Mots-clés :** *Marteilioides chungmuensis*, n.g., n.sp., — Parasite — Ovocytes — Huître — *Crassostrea gigas* — Paramyxea — Ultrastructure — Sporogénèse.

ABSTRACT

Ultrastructural study of a parasite first reported in Korea (1978) in the ovocytes of the oyster *Crassostrea gigas* then refound in oysters of Chungmu bay (1984). The observed stages are typical of those of Paramyxea LEVINE 1980. The development consists of the production of secondary cells within a stem cell. These secondary cells produce themselves one tertiary cell. The differentiation of a single tricellular spore by the sporont distinguishes the studied parasite from the other Paramyxea.

**Key words :** *Marteilioides chungmuensis*, n.g., n.sp. — Parasite — Ovocytes — Oyster — *Crassostrea gigas* — Paramyxea — Ultrastructure — Sporogénèse.

## INTRODUCTION

L'existence d'un parasite des ovocytes de l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* a été signalée à différentes reprises au Japon (IMAI *et al.*, 1968; MATSUZATO *et al.* 1977) et en Corée (CHUN, 1979). Sa structure et son mode de développement n'ont pas été jusqu'à présent clairement définis. Consécutivement, sa position systématique est demeurée incertaine.

On mentionnera qu'un parasite voisin, non identifié, a été par ailleurs observé chez l'huître *Crassostrea echinata* (WOLF, 1977).

Récemment, à la suite de contrôles zoosanitaires effectués dans la région de Chungmu (Corée), l'étude de ce parasite de *C. gigas* a pu être reprise et approfondie.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les tissus infestés ont été traités selon la technique de la double fixation par le glutaraldéhyde et l'acide osmique (tampon cacodylate de sodium 0,4 M) et inclus après déshydratation à l'éthanol dans la résine Epon. Les coupes ultrafines ont été contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

## RÉSULTATS

Le parasite est localisé dans les ovocytes où l'on peut observer différentes phases de son développement intracytoplasmique caractérisé par un mode de multiplication cellulaire par bourgeonnement endogène (Fig. 1). Les premiers stades évolutifs du parasite sont représentés par des complexes bicellulaires formés d'une cellule primaire (cellule souche) emboîtant une cellule secondaire (Fig. 1 et 2); cet ensemble généralement parasphérique ou ovoïde a un diamètre moyen de 3 à 3,5  $\mu\text{m}$ .

La cellule primaire ou cellule souche amoeboïde est limitée par un plasmalemme étroitement appliqué à une membrane différenciée par la cellule-hôte. Le cytoplasme, riche en ribosomes souvent regroupés en amas, contient également des inclusions osmiophiles de forme ovoïde ou en bâtonnets, d'une taille moyenne de 120 nm (Fig. 4). De telles inclusions ont été également décrites sous le nom d'haplosporosomes dans les cellules primaires de *Marteilia refringens* (PERKINS, 1976) et de *M. sydneyi* (PERKINS and WOLF, 1976) tous deux parasites d'huîtres; elles sont aussi signalées chez *Paramarteilia orchestiae* (GINSBURGER-VOGEL et DESPORTES, 1979) et chez *Paramyxa paradoxa* (DES-PORTES, 1981).

Parmi les éléments figurés du cytoplasme on trouve encore des formations de type ergastoplasmique enveloppant partiellement la cellule secondaire. Elles sont consti-

tuées d'un empilement de saccules aplatis qui, par endroits, développent des citernes au contenu densément granuleux; ces dernières, très polymorphes, peuvent mesurer jusqu'à 0,8  $\mu\text{m}$  de long sur 0,5  $\mu\text{m}$  de large (Fig. 3).

Le contenu du noyau apparaît comme relativement peu dense et le nucléole est généralement en situation pariétale.

Les cellules secondaires individualisées dans les cellules souches sont ovoïdes ou parasphériques et mesurent de 2 à 2,5  $\mu\text{m}$  de diamètre pour les premiers stades observables; leur noyau appliqué à la membrane possède un nucléole volumineux, excentré. Les mitochondries, peu nombreuses (une à deux) sont caractérisées par leur faible opacité et l'absence presque totale de crêtes. Les ribosomes très abondants sont regroupés en plages granuleuses, irrégulièrement distribuées.

A partir de ces formes simples, le développement du parasite est marqué par un accroissement de la taille de la cellule souche consécutif à la multiplication des cellules secondaires. On trouve ainsi des stades du parasite comprenant deux et parfois trois cellules secondaires (Fig. 5 et 6). Ces dernières présentent une concentration en ribosomes plus forte que celle des stades précédents; des formations centriolaires peuvent être observées (Fig. 7).

L'évolution ultérieure du parasite se manifeste par un bourgeonnement endogène asynchrone des cellules secondaires aboutissant à la production de cellules tertiaires ovoïdes, de petite taille (2  $\mu\text{m}$   $\times$  1,5  $\mu\text{m}$ ) et présentant les caractères de cellules indifférenciées (volume important du noyau et du chondriome par rapport à celui de l'ensemble de la cellule) voire du sporoplasme décrit chez certaines *Paramyxa* (DES-PORTES, 1984) (Fig. 6 et 7). Parallèlement certains remaniements s'opèrent dans la cellule secondaire avec la production de nombreuses inclusions cytoplasmiques osmiophiles et la différenciation de formations membranaires jouxtant la membrane plasmique de la cellule tertiaire (Fig. 7).

On remarque l'identité structurale entre l'ensemble constitué par une cellule secondaire emboîtant une cellule tertiaire et les premières formes observables du parasite (cellule souche + cellule secondaire) (Fig. 1 et 2).

Le stade le plus commun du parasite est représenté par des formations polymorphes, le plus souvent au nombre de deux et situées dans une aire cytoplasmique très altérée qui correspond probablement à la cellule-souche dégénérante (Fig. 8 à 10). Ces formations qui mesurent de 10 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre environ sont entourées par une paroi de 90 nm d'épaisseur faite d'une couche dense de 50 nm, elle-même doublée d'une membrane externe (Fig. 11). A l'intérieur, on trouve une première couche cytoplasmique dont il ne subsiste le plus souvent que quelques amas ribosomiques et des trabécules vermiformes opaques aux électrons, la plus grande partie étant occupée par de grandes lacunes limitées par une membrane et renfermant les éléments cytoplasmiques résiduels peu denses. Cette aire périphérique qui, au stade de nos observations, ne présente pas de noyau, englobe un ensemble de trois cellules emboîtées (Fig. 8).

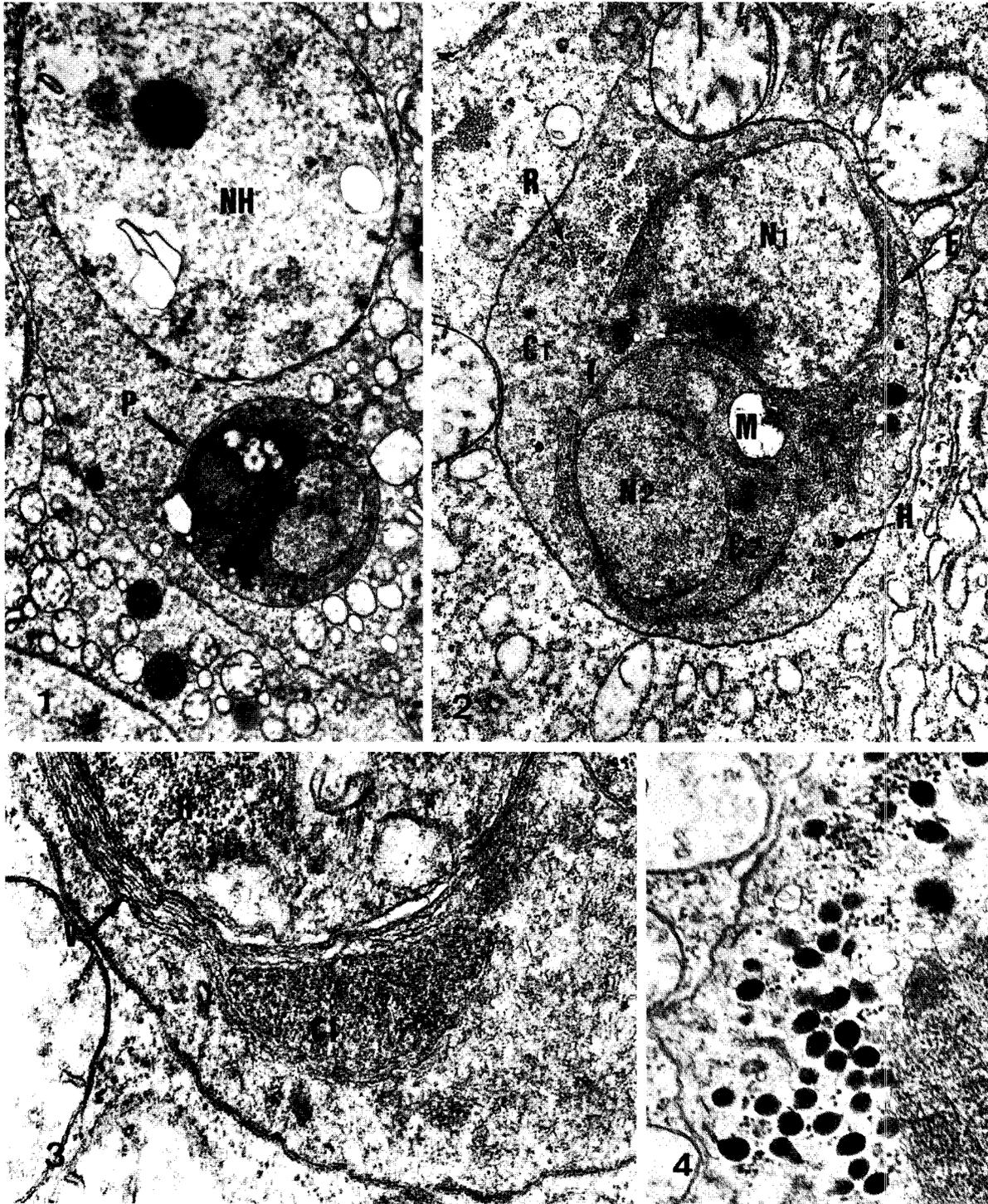
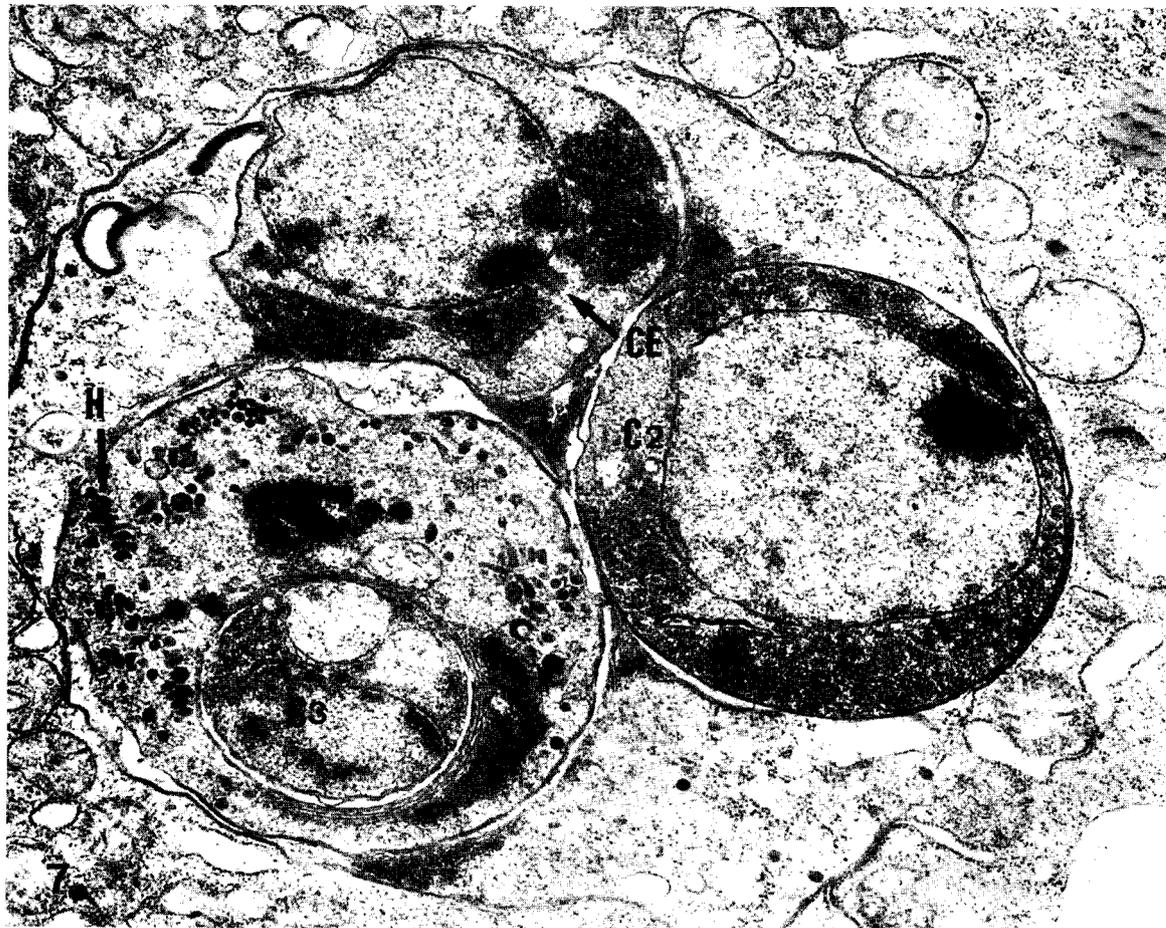
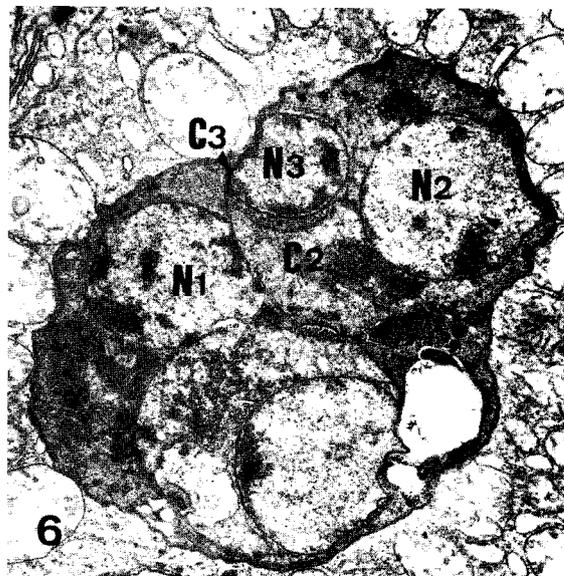
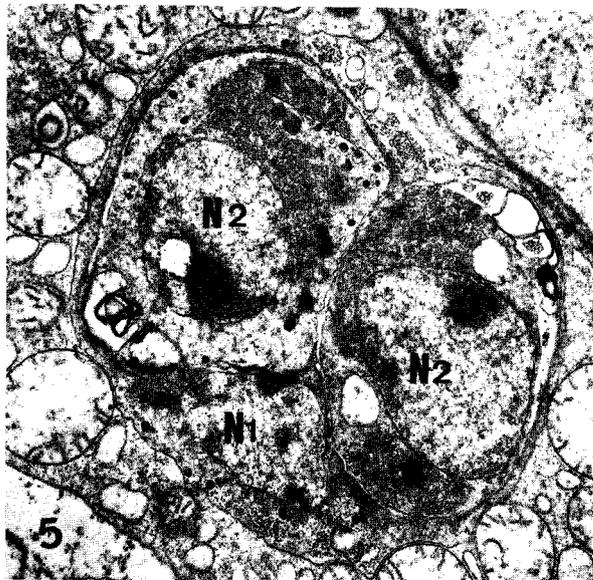


FIG. 1. — Formes jeunes du parasite (P) localisées dans le cytoplasme d'un ovocyte; NH, noyau de la cellule hôte ( $\times 11\,300$ ).

FIG. 2. — Stade bicellulaire comprenant la cellule souche (C1) contenant une première cellule secondaire (C2). R, amas de ribosomes; E, formation ergastoplasmique; H, haplosporosome; M, mitochondrie; N1 et N2, noyaux des cellules primaire (souche) et secondaire ( $\times 32\,000$ ).

FIG. 3. — Formations vésiculaires aplaties (V) associées à une citerne au contenu granuleux (C1); R, ribosomes ( $\times 54\,000$ ).

FIG. 4. — Haplosporosomes de la cellule primaire ( $\times 40\,000$ ).



La cellule externe, dont le noyau est parfois visible, possède un cytoplasme caractérisé par la présence de grains osmiophiles inclus dans une vésicule; un matériel amorphe moins dense s'accumule sous la membrane de cette vésicule d'abord à un pôle, pouvant ensuite s'étendre pour former une couche régulière autour du corps osmiophile; leur taille atteint alors 300 à 400 nm. La présence de ces corps pourrait coïncider avec une rétraction cytoplasmique sous pariétale, phénomène signalé par DESPORTES (1981) à propos de l'apparition des haplosporosomes sporaux de *Marteilia refringens* (PERKINS, 1976), *M. sydneyi* (PERKINS et WOLF, 1976) et de *Paramyxa paradoxa* (DESPORTES, 1981).

La cellule intermédiaire, de forme parasphérique, mesure 5 à 6 µm de diamètre; elle est caractérisée par un cytoplasme densément granuleux dans lequel on reconnaît de nombreuses inclusions osmiophiles mesurant 80 à 100 nm. Dans cette cellule est emboîtée une cellule interne ovoïde de 3 à 5 µm, au cytoplasme également dense, cette dernière pouvant se dédoubler (Fig. 10). Ces cellules présentent les caractères des cellules jeunes encore peu différenciées : cytoplasme riche en ribosomes, noyau avec un volumineux nucléole, mitochondries à matrice claire tels qu'on les observe dans les jeunes cellules secondaires (Fig. 2). Parvenues à ce stade de leur développement, ces formations pourraient dégénérer : certaines figures montrent en effet une altération profonde des différents éléments cellulaires avec en particulier la formation de nombreuses particules parasphériques d'opacité variable et mesurant 90 à 130 nm de diamètre.

## DISCUSSION

Le développement du parasite des ovocytes de l'huître du Pacifique (individualisation de plusieurs cellules secondaires dans une cellule souche et de cellules tertiaires dans les cellules secondaires) ainsi que ses caractères cytologiques (cellules jeunes à cytoplasme riche en ribosomes et aux mitochondries à matrice claire, centrioles appliqués à l'enveloppe nucléaire...) sont comparables à ceux de tous les représentants connus de la classe des *Paramyxea* (DESPORTES, 1984). Ils caractérisent plus particulièrement les premières séquences de leur développement, c'est-à-dire l'individualisation des sporontes (cellules secondaires) dans les cellules souches et l'acquisition par ceux-ci de cellules tertiaires.

Chez toutes les *Paramyxea* connues le sporonte donne naissance à plusieurs formes de dissémination (= spores)

faites de cellules emboîtées. Son évolution dans le parasite ici étudié paraît différente de ce qui a été jusqu'ici décrit.

La forme de dissémination correspond très probablement aux grandes formations polymorphes de 10 à 12 µm, limitées par une paroi et qui résultent d'une évolution des jeunes sporontes bicellulaires (C<sub>2</sub>C<sub>3</sub>). Parallèlement à un accroissement de son volume et de celui de la cellule tertiaire, le sporonte acquiert une paroi comparable à celle des sporontes et des spores de *M. refringens* (PERKINS, 1976).

La cellule tertiaire évolue en cellule sporale externe (CSI) à grains cytoplasmiques osmiophiles, produisant par endogénèse une cellule sporale intermédiaire (CS2) fournissant elle-même, également par bourgeonnement endogène, une cellule sporale interne (CS3) (= sporoplasme) susceptible de se dédoubler (Fig. 11).

Dans certaines conditions, les formes les plus âgées du parasite pourraient dégénérer (Fig. 13).

Comme il ressort de cette étude, la sporogénèse du parasite des ovocytes de *C. gigas* serait la plus simple de toutes celles observées jusqu'ici chez les *Paramyxea*. La sporonte (= cellule secondaire) se transformerait directement en une forme de dissémination unique, faite de lui-même et de trois cellules sporales emboîtées alors qu'il produit deux spores bicellulaires chez *Paramarteilia*, quatre spores tricellulaires chez *Marteilia* et quatre spores tétracellulaires (plus un cinquième élément présumé dégénératif) chez *Paramyxa* (DESPORTES, 1984).

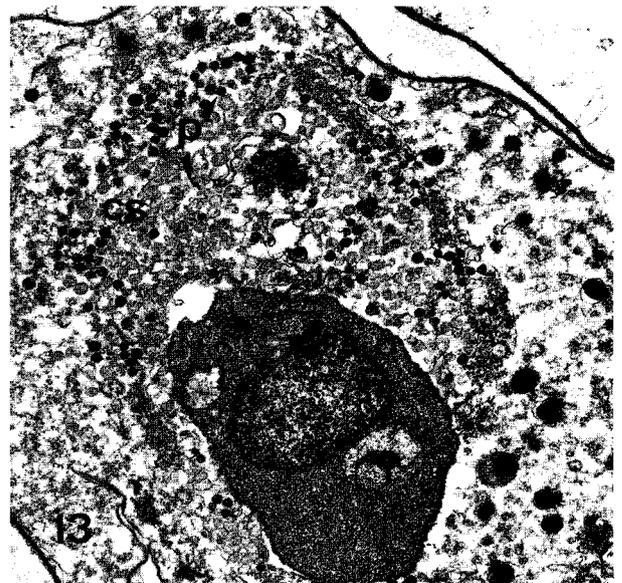
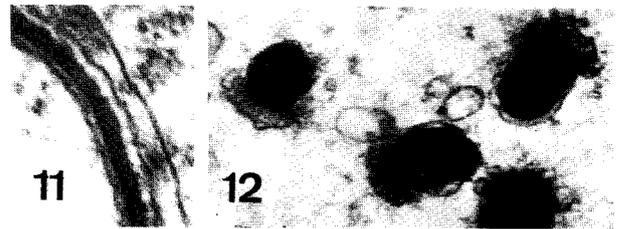
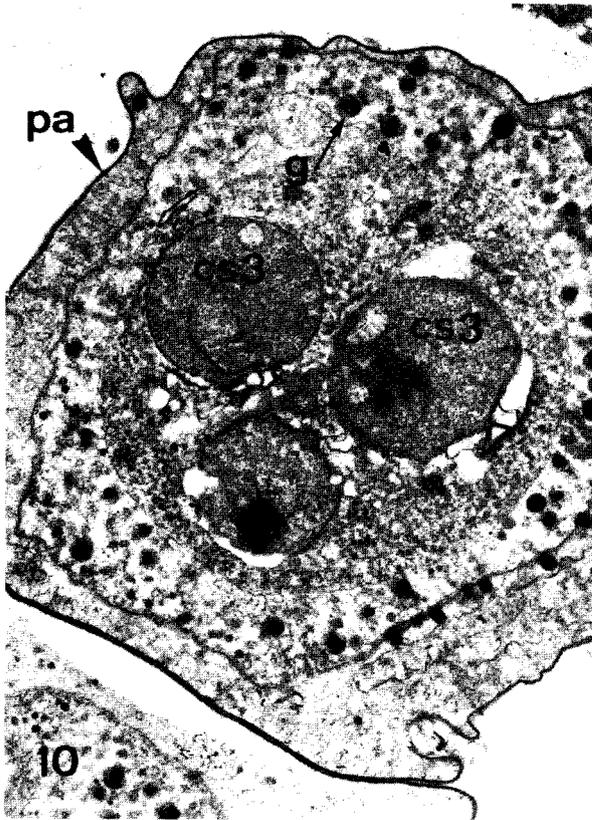
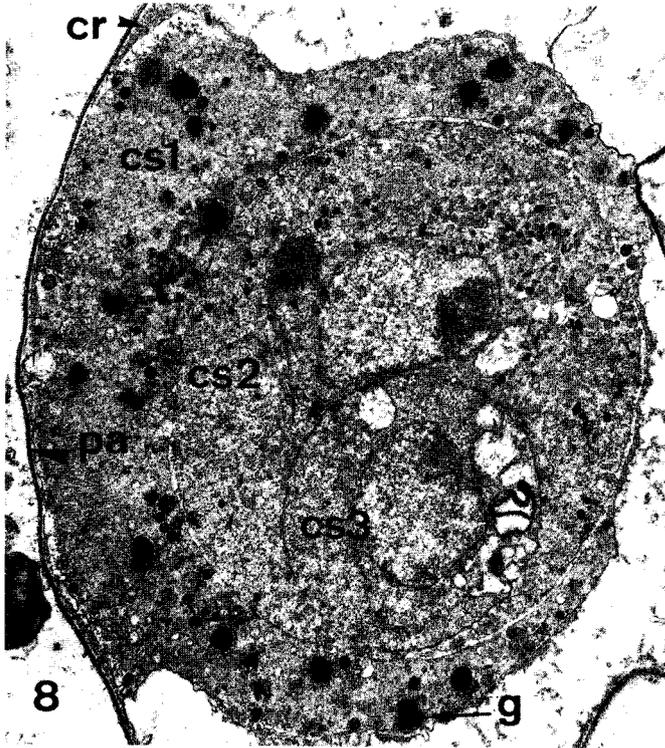
Il convient enfin de mentionner que la similitude entre le complexe cellule souche — première cellule secondaire et le jeune sporonte constitué des cellules C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> (Fig. 7) suggère la possibilité pour le parasite d'évoluer suivant un cycle court assurant une dissémination intracellulaire de celui-ci. On notera d'ailleurs que la jeune cellule tertiaire C3 présente dans l'une des deux cellules secondaires de la Figure 7 a tout-à-fait l'habitus du sporoplasme des autres *Paramyxea* : *Marteilia* et *Paramarteilia* plus particulièrement (GINSBURGER-VOGEL et DESPORTES, 1979).

En conclusion, par son développement caractérisé par l'individualisation de sporontes dans une cellule-souche et la formation de spores à cellules emboîtées à partir de ces sporontes, le parasite de *Crassostrea gigas* appartient indubitablement à la classe des *Paramyxea*. Sa sporogénèse simplifiée (évolution du sporonte en une seule forme de dissémination = spore), la morphologie originale des inclusions osmiophiles de la cellule sporale externe suggèrent de créer pour lui un genre nouveau. La différenciation de trois cellules sporales caractérise les représentants du genre *Marteilia* dont certains sont également hébergés par des huîtres. Toutefois, quatre de ces spores sont produites

FIG. 5. — Cellule souche à noyau N1 contenant deux cellules secondaires (noyaux N2) (× 10 000).

FIG. 6. — Bourgeonnement endogène d'une cellule tertiaire (C3) dans une cellule secondaire (C2). N1, N2, N3, noyaux des cellules primaire, secondaire et tertiaire (× 10 000).

FIG. 7. — Section montrant différents stades de l'évolution des cellules secondaires en formes de dissémination : C2, cellule secondaire dans laquelle un centriole (CE) est visible au contact de l'enveloppe nucléaire; l'individualisation d'une cellule tertiaire (C3) s'accompagne de la prolifération des haplosporosomes (H) dans le cytoplasme de la cellule secondaire. (× 15 000).



par chaque sporonte dans ce dernier genre; de plus, comme nous l'avons dit plus haut, les inclusions osmiophiles ici décrites dans la cellule sporale externe sont différentes de celles vues chez les *Marteilia*.

Deux ordres ont été distingués à l'intérieur de la classe des Paramyxia (DESORTES, 1981, 1984) : les Paramyxida dont la sporogénèse s'accompagne de la production puis du rejet d'une petite cellule supplémentaire, interprétée comme un globule polaire et les Martelliida qui n'en forment pas. Nous n'avons pas observé la différenciation d'une telle cellule dégénérative chez le parasite ici décrit. Par contre, son développement est tout-à-fait comparable à celui des Martelliida, ordre comprenant actuellement les genres *Marteilia* et *Paramarteilia*. Nous proposons donc de le nommer *Marteilioides chungmuensis* n.g., n.sp., l'appellation spécifique se référant à la localité de l'hôte.

## DIAGNOSE

### *Marteilioides* n.g.

— Formes végétatives représentées par des cellules amoeboïdes dans lesquelles s'individualisent plusieurs cellules secondaires.

— Sporulation caractérisée par la transformation du sporonte (= cellule secondaire) en une forme de dissémination comprenant le sporonte lui-même qui pratiquement réduit à sa paroi, constitue une enveloppe autour des trois cellules sporales emboîtées.

### *Marteilioides chungmuensis* n.g., n.sp.

— Cellule souche amoeboïde uninucléée contenant des haplosporosomes et des saccules ergastoplasmiques aplatis; cellules secondaires évoluant en formes de dissémination tétracellulaires (cellule secondaire + trois cellules sporales) de 10 à 12 µm; présence de corps osmiophiles globuleux de 400 µm dans le cytoplasme de la cellule sporale externe. Division fréquente de la cellule sporale la plus interne (C3).

— Hôte : *Crassostrea gigas* (THUNBERG), Mollusque Lamellibranche.

— Localisation dans l'hôte : ovocytes.

— Localité : Baie de Chungmu (Corée).

## BIBLIOGRAPHIE

- CHUN S.K. (1979). — Amoeba infection in oyster (*Crassostrea gigas*). *Bull. Korean Fish. Soc.*, **12** (4), 281-285.
- COMPS M. (1983-1985). — Etude morphologique de *Marteilia christenseni* sp. n. parasite du Lavignon *Scrobicularia piperata* p. (Mollusque Pélécyopode). *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **47** (1 et 2), 99-104.
- DESORTES I. (1981). — Etude ultrastructurale de la sporulation de *Paramyxia paradoxa* CHATTON (Paramyxida) parasite de l'annélide polychète *Poecilochaetus serpens*. *Protistologica*, **17** (3), 365-386.
- DESORTES I. (1984). — The Paramyxia LEVINE 1979 : an original example of evolution towards multicellularity. *Origins of Life*, **13**, 343-352.
- GINSBURGER-VOGEL T. et DESORTES I. (1979). — Etude ultrastructurale de la sporulation de *Paramarteilia orchestiae* gen. n. sp. n. parasite de l'amphipode *Orchestia gammarellus* (PALLAS). *J. Protozool.*, **26** (3), 390-403.
- IMAI T., MORI K., SUGAWARA Y., TAMATE H., OIZUMI J. et ITIKAWA O. (1968). — Studies on the mass mortality of oyster in Matsushima Bay. VII. Pathogenetic investigation. *Tohoku J. Agricult. Res.*, **19** (4), 250-264.
- LEVINE N.D., CORLISS J.O., COX F.E.G., DEROUX G., GRAIN J., HONIGBERG B.M., LEEDALE G.F., LOEBLICH A.R., LOM J., LYNN D., MERINFELD E.G., PAGE F.C., PALJANSKY G., SPRAGUE V., VAVREA J. et WALLACE F.G. (1980). — A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, **27**, 37-58.
- MATSUZATO T., HOSHINA T., ARAKAWA K. et MASUMURA K. (1977). — Studies on the so-called abnormal egg-mass of Japanese oyster *Crassostrea gigas* (THUNBERG)-I. *Bull. Hiroshima Fish. Exp. St.*, n° 8, 9-25.
- PERKINS F.O. (1976). — Ultrastructure of sporulation in the European flat oyster pathogen *Marteilia refringens*. Taxonomic implication. *J. Protozool.*, **23** (1), 64-74.
- PERKINS F.O. and WOLF P.H. (1976). — Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. — Haplosporidan pathogen of Australian oysters. *J. Parasitol.*, **62**, 528-538.
- WOLF P.H. (1977). — An unidentified Protistan Parasite in the ova of the Blacklipped oyster, *Crassostrea echinata*, from Northern Australia. — *J. Invertebr. Pathol.*, **29**, 244-246.

FIG. 8, 9 et 10. — Formes de dissémination caractérisées par la présence d'une paroi (PA) et de grains osmiophiles (G) localisés dans la cellule sporale externe (CS1) : Fig. 8 et 9, bourgeonnement endogène de la cellule sporale externe (CS1) avec production d'une cellule sporale intermédiaire (CS2) contenant elle-même le sporoplasme (CS3); CR, cytoplasme résiduel du sporonte délimité par la paroi (PA) (× 12 000 et 8 000). Fig. 10, spore avec deux cellules CS3 (× 8 000).

FIG. 11. — Détail de la paroi (× 42 000).

FIG. 12. — Détail des inclusions denses cytoplasmiques (= grains osmiophiles) (× 36 000).

FIG. 13. — Forme en cours de dégénérescence avec formation de nombreuses particules (P) dans le cytoplasme de la cellule CS2 (× 11 000).